

ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ НАНОЧАСТИЦ СЕЛЕНА, СИНТЕЗИРОВАННЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИСКУССТВЕННОГО МЕТАЛЛСВЯЗЫВАЮЩЕГО ОПУХОЛЕСПЕЦИФИЧНОГО БЕЛКА W8-3C

© 2024 г. Н.В. Позднякова*, **, Ю.К. Бирюкова***, З.А. Соколова*, М.А. Барышникова*, Е.С. Щербакова**, ****, #, М.С. Смирнова**, А.Б. Шевелев**

*Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н. Н. Блохина Минздрава России, Каширское шоссе, 24, Москва, 115522, Россия

**Институт общей генетики имени Н.И. Вавилова РАН, ул. Губкина, 3, Москва, 119991, Россия

***Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН, ул. Косыгина, 4, Москва, 119334, Россия

****НИИ «Генетика» Курского государственного университета, ул. Радищева, 33, Курск, 305000, Россия

#E-mail: ledera@yandex.ru

Поступила в редакцию 02.02.2024 г.

После доработки 02.02.2024 г.

Принята к публикации 07.02.2024 г.

Впервые создана и описана конструкция pW8-3C, кодирующая искусственный опухоль-специфичный белок W8-3C с добавлением трех остатков свободного цистеина на С-конце. С использованием очищенного белка W8-3C впервые получены и охарактеризованы дисперсии наночастиц диаметром 75.24 нм при индексе полидисперсности Pdi, равном 0.064, с содержанием селена 1566 мкг/мл. Дисперсии сохраняли стабильность при хранении в течение 6 месяцев при 4°C. Для сравнения: максимальное содержание селена в составе дисперсии наночастиц, полученных в присутствии белка W8-3C и плюрониона F-127, составляло 399 мкг/мл. Исследована цитотоксическая активность полученных наночастиц на перевиваемых клетках опухолевых линий человека: HeLa (карцинома шейки матки), U-87 MG (глиобластома), MCF-7 (карцинома молочной железы) и HCT-116 (карцинома толстой кишки) в сравнении с диплоидной линией фибробластов человека WI-38 *in vitro*. Показано, что IC_{50} наночастиц селена, полученных с использованием белка W8-3C, для опухолевых линий колеблется в диапазоне от 5.25 до 8.37 мкг/мл, тогда как IC_{50} для нормальных фибробластов составила 14.3 мкг/мл (отличие в 1.7–2.7 раза).

Ключевые слова: селен, наночастицы, рекомбинантный белок, опухоль, цитотоксичность, IC_{50} , цистеин.

DOI: 10.31857/S0006302924050096, EDN: MKBK KU

Наночастицы доказали свою эффективность в качестве носителей пролекарств в качестве средства доставки терапевтических молекул [1]. Наночастицы различных металлов, таких как Ag, Au, Se, Fe, Se, Ti и Zn, и их оксидов обладают биологической активностью, не свойственной этим элементам в виде солей [2]. Селен (Se) является важным микроэлементом, входящим в состав белков в форме селеноцистеина [3]. Замена цистеина на селеноцистеин существенно влияет на активность, протеолитическую стабильность и биораспределение ферментов, регуляторных факторов и структурных белков [3, 4]. Известны селенопротеины с оксидоредуктазной активно-

стью, присутствие которых в клетках необходимо для поддержания естественного окислительно-восстановительного баланса (нормального функционирования дыхательной цепи и недопущения накопления избытка активных форм кислорода) [5]. Se в металлической форме имеет узкое терапевтическое окно, обусловленное выраженной концентрационной зависимостью его токсичности [6]. Напротив, наночастицы металлического Se (SeNP) обладают сниженной токсичностью [7]. Наночастицы SeNP рассматриваются в качестве кандидата лекарственного средства для лечения ряда заболеваний, связанных с окислительным стрессом и воспалением: ревматоидного артрита, рака, сахарного диабета, нефропатии и других [1, 2]. За счет способности образовывать с атомами серы в белках и низкомолекулярных соединениях прочные связи, аналогичные дисуль-

Сокращения: SeNP — наночастицы металлического Se, ICP-OES — оптико-эмиссионная спектроскопия с индуктивно связанной плазмой.

фидным, SeNP представляют собой привлекательную платформу для создания новых методов визуализации и направленной доставки лекарств в очаги патогенеза при различных заболеваниях [10, 11]. Однако развитие этого направления в фармакологии ограничивается недостаточной устойчивостью SeNP, полученных без использования пассивирующих поверхность агентов: при хранении они быстро подвергаются необратимой агрегации, что делает невозможным их применение *in vivo* [12]. Для стабилизации SeNP традиционно применяют различные биополимеры и малые биомолекулы: куркуму [13], глутатион [14], сывороточный альбумин [15], галовую [16] и фолиевую кислоты [17]. Наиболее популярным классом соединений, применяемым для стабилизации SeNP, являются полисахариды (хитин, хитозан, дрожжевые или грибные β -1,3-глюканы) [18–22].

Из числа синтетических полимеров наиболее активно используются плуроники (полоксамеры – тройные блок-сополимеры этиленоксида и пропиленоксида) [23] и производные полиэтиленгликоля [24]. Однако предложенные методики получения SeNP с применением этих агентов не обладают необходимой воспроизводимостью, а получаемые с их помощью дисперсии SeNP сохраняют устойчивость только при невысоких концентрациях, недостаточных для практического применения [25].

В литературе неоднократно высказывалось мнение, что SeNP обладают противоопухолевыми и иммуномодулирующими свойствами [26, 27]. По всей видимости, SeNP по-разному влияют на окислительно-восстановительный механизм раковых и нормальных клеток [28, 29]. Механизмы цитотоксического действия наночастиц Se в различных линиях раковых клеток человека исследовались ранее [30]. Так, в работе [31] методом лазерной абляции в жидкости были получены SeNP размером 100 нм и были исследованы цитотоксические эффекты и механизмы гибели ряда опухолевых клеток. Авторы показали, что обработка в течение 24 ч клеток A-172 и DU-145 10 мкг/мл SeNP приводила к снижению их пролиферативных свойств на 70–80%, а для клеток Caco-2 и MCF-7 этот показатель составлял примерно 50–60% через 24 ч после их обработки 1 мкг/мл и 5 мкг/мл SeNP. С помощью флуоресцентной микроскопии были обнаружены признаки апоптотической гибели раковых клеток всех изученных линий при обработке их 5 мкг/мл SeNP, также SeNP усиливали экспрессию проапоптотических генов почти во всех линиях раковых клеток, за исключением Caco-2, и активировали различные пути адаптивных и проапоптотических сигнальных путей UPR [31].

Наряду с проапоптотической и цитотоксической активностью у SeNP описана антиоксидантная и иммуностимулирующая активность [32]. Так, в работе [33] описан способ синтеза SeNP со средним диаметром от 64.1 до 110.1 нм с использованием в качестве стабилизатора дрожжевого β -1,3-глюкана, а в качестве агента, вызывающего формирование ковалентных связей между селеном и биополимером, – облучение рентгеновскими лучами с помощью источника излучения на основе ^{60}Co . Биологические испытания синтезированных таким образом частиц показали, что при внутрибрюшинном введении в дозировке 6 мг/кг живой массы SeNP вызывают частичное восстановление содержания в крови и костном мозге лейкоцитов (с 19 до 42% от нормы), лимфоцитов (с 14 до 28% от нормы), нейтрофилов (с 0.2 до 2.5% от нормы), В-лимфоцитов (с 0.3 до 1.8% от нормы), натуральных киллеров (с 0.5 до 3.8% от нормы), лимфоцитов с фенотипом CD4^+ (с 0.2 до 6.1% от нормы) и иммуноглобулинов (с 600 до 1700 мкг/мл) у мышей, подвергшихся действию распространенного химиопрепарата цитоксан (циклофосфамид), для которого характерно угнетающее действие на активность иммунной системы. При этом содержание в крови интерферона γ (цитокина иммунного ответа Th1-типа) после введения SeNP оставалось неизменным. В работе [34], напротив, сообщается о стимуляции SeNP иммунного ответа Th1-типа в ущерб ответу Th2-типа.

Имеются сообщения об использовании для синтеза SeNP живой культуры пробиотического штамма *Lactobacillus casei*: диаметр частиц, полученных таким способом, составил ~360 нм, обработка клеточных линий рака толстой кишки этими наночастицами приводила к появлению маркеров гибели клеток за счет апоптоза [35].

Ранее авторами настоящей работы была разработана линейка искусственных белков W4, W8 и W12, несущих металлсвязывающий центр (сформирован из фрагментов Ca^{2+} -связывающего центра кальмодулина человека и ELP-повторов), а также белковые лиганды, связывающие онкомаркеры: RGD-мотив (лиганд $\alpha\text{V}\beta 3$ -интегрина) и F3 (лиганд нуклеолина). В отличие от большинства природных белков, данные белки не имеют гидрофобного кора и не обладают глобулярной структурой, постоянно находясь в состоянии расплавленной глобулы. Предыдущие исследования показали высокую эффективность белков W4, W8 и W12 в качестве носителей для доставки ионов Gd^{3+} в опухолевые клетки (в том числе карциномы молочной железы, легкого, толстой кишки и глиобластомы), что позволяет рассматривать их в качестве кандидатов для разработок препаратов для контрастирования опухолей при проведении

Собранная биомасса использовалась для очистки рекомбинантного белка методом, описанным ранее [36]. Процедура получения белка включала в себя этап металл-хелатной хроматографии (IMAC) на смоле HisPur™ Ni-NTA, а также обязательный этап удаления ионов металлов из металлсвязывающих участков с помощью интенсивного диализа раствора белка после обработки ЭДТА. Гомогенность препарата белка W8-3C подтверждали методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия. Концентрацию белка измеряли с помощью модифицированного метода Лоури с использованием бицинхониновой кислоты (BCA assay kit, Sigma, США) в соответствии с рекомендациями производителя.

Синтез наночастиц селена, стабилизированных белком W8-3C. *Реагенты:* NaBH_4 (Sigma-Aldrich, CAS:16940-66-2), Na_2SeO_3 (Sigma-Aldrich, CAS:10102-18-8), Плюроник® F-127 (Sigma-Aldrich, CAS:9003-11-6), азотная кислота для проведения элементного анализа (Sigma-Aldrich, CAS:7697-37-2), стерильный физиологический раствор 0.15 М NaCl (pH 7.4) (ПанЭко, Россия), очищенный раствор белка W8-3C.

Протокол получения наночастиц № 1 (с белком W8-3C). К 2 мл белка W8-3C (3 мг/мл в стерильном физиологическом растворе) добавили 100 мкл 1 М водного раствора Na_2SeO_3 при перемешивании в течение 1 мин (итоговая концентрация иона селенита 50 мМ). Затем перенесли полученный раствор в пробирку с навеской NaBH_4 в 19.1 мг, интенсивно перемешали на вортексе в течение 30 с до полного растворения (итоговая концентрация иона боргидрида 13.5 мМ), после чего перемешивали на встряхивателе Eppendorf при 37°C, 900 об/мин, в течение 15 мин до образования оранжево-красного цвета. Раствор образовавшихся наночастиц диализовали против 1 л стерильного физиологического раствора дважды по 24 ч со сменой буфера при комнатной температуре.

Протокол получения наночастиц № 2 (с белком W8-3C и плюронином F-127). К 2 мл белка W8-3C (3 мг/мл в стерильном физиологическом растворе) добавили 100 мкл 1 М водного раствора Na_2SeO_3 (до 50 мМ) и 40 мкл 0.5% водного раствора F-127 (до 0.01%) при перемешивании. Раствор перенесли в пробирку с навеской NaBH_4 в 20.1 мг (13.5 мМ) и перемешали в течение 30 с до полного растворения на вортексе, далее перемешивали на встряхивателе Eppendorf при 37°C, 900 об/мин, в течение 45 мин до образования оранжево-красного цвета (образование окраски идет медленнее, чем при использовании Протокола 1). Дисперсию наночастиц диализовали против 1 л стерильного физиологического раствора

дважды по 24 ч со сменой буфера. По окончании диализа полученные растворы хранились при 4°C с соблюдением правил асептики.

Элементный анализ методом оптико-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой (ICP-OES). Образцы для ICP-OES готовили путем добавления 2 объемов концентрированной азотной кислоты и нагреванием при 60°C в течение 30 мин, после чего растворы разбавляли деионизированной водой и фильтровали через фильтр Millex 0.45 мкм (Merck, Германия). Калибровочные стандарты готовили из исходного одноэлементного калибровочного ICP-стандарта (10000 мг/л, Se, HNO_3 , кат. №: CGSE10-500ML, Inorganic Ventures, США) путем разведения в 2% (масс.) HNO_3 . В качестве холостого образца использовали 2%-й водный раствор HNO_3 . Измерения проводили на ICP-OES-спектрометре PlasmaQuant 9100 series (Analytik Jena, Германия).

Распределение частиц по размеру. Распределение частиц по размерам исследовали методом динамического рассеяния света на приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Великобритания) с использованием Zetasizer Softwave V.7.12. В качестве растворителя использовали воду MilliQ высокой чистоты (сопротивление не менее $16 \text{ МОм} \cdot \text{см}^{-1}$).

Клеточные линии и условия их культивирования. В работе использовали следующие клеточные линии человека (приобретенные из коллекции ATCC – American Type Culture Collection): HeLa (ATCC CRM-CCL-2) – рак шейки матки, U-87 MG (ATCC HTB-14) – злокачественная глиома, MCF-7 (ATCC HTB-22) – аденокарцинома протоков молочной железы, HCT-116 (ATCC CCL-247) – колоректальная карцинома, WI-38 (ATCC CCL-75) – линия первичных фибробластов человека.

Клетки выращивали в среде DMEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 4 мМ L-глутамин, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина в атмосфере 5% CO_2 и при температуре 37°C.

Оценка цитотоксичности с помощью МТТ-теста. В лунки 96-луночного культурального планшета Costar вносили по 5–10 тыс. клеток и культивировали в стандартной среде RPMI-1640 (ПанЭко, Россия), содержащей 10% сыворотки эмбриональной телячьей крови (Gibco), 2 мМ L-глутамин и раствор пенициллина-стрептомицина (5000 ЕД/мл пенициллина и 5000 ЕД/мл стрептомицина, ПанЭко, Россия) при 37°C в атмосфере 5% CO_2 в течение 24 ч. Затем к клеткам добавляли раствор наночастиц селена Se-W8-3C в диапазоне от 0.3 до 78 мкг/мл по селену и инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO_2 в течение 24 ч и 48 ч. Перед добавлением раствора МТТ планшеты с клетками центрифугировали 5 мин

при 1500 об/мин, отбирали среду с раствором частиц Se-W8-3C, один раз отмывали 200 мкл полной питательной среды, после чего добавляли в лунки 200 мкл раствора МТТ (3-(4,5-диметилтиазолин-2)-2,5 дифенилтетразолий бромид) в полной ростовой среде и инкубировали 4 ч при 37°C в 5% CO₂. После образования кристаллов формазана планшеты с клетками центрифугировали, надосадочную жидкость удаляли, осадок растворяли в 150 мкл диметисульфоксида. Интенсивность поглощения измеряли при $\lambda = 570$ нм с помощью планшетного спектрофотометра Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, США).

Процентную долю живых клеток (B , %) определяли по формуле:

$$B = (O_o/O_k) \times 100,$$

где O_k — оптическая плотность в контрольных лунках, O_o — оптическая плотность в опытных лунках.

Цитотоксичность (C , %) определяли по формуле:

$$C = (1 - (O_o/O_k)) \times 100\%.$$

Каждое измерение проводилось в трех независимых технических повторностях, результаты усреднялись.

Расчет концентрации полумаксимального ингибирования роста IC_{50} методом линейной экстраполяции. По полученным данным о выживших клетках после воздействия разной концентрации Se-W8-3C в течение 24 и 48 ч (результаты МТТ-теста, выраженные в процентных долях выживших клеток от контроля — интактных клеток, для которых установлено значение 100%), где каждая

величина представляет собой среднее значение $\pm$ стандартное отклонение (SD) ($n \geq 3$, $p < 0.05$) (рис. 4) методом линейной экстраполяции был проведен математический расчет концентрации полумаксимального ингибирования роста IC_{50} (табл. 1). Для каждой группы (клеточной линии) была выстроена линия тренда и выведена формула зависимости $Y(X)$ с величиной достоверности аппроксимации R^2 с использованием пакета Microsoft Excel (Microsoft, США). По полученным формулам для каждой группы клеток проведен расчет Y — концентрации исследуемого вещества, при которой процентная доля выживших клеток составляет 50 (X). Коэффициент достоверности аппроксимации R^2 показывает степень соответствия трендовой модели исходным данным. Его значение может лежать в диапазоне от 0 до 1. Чем ближе R^2 к 1, тем точнее модель описывает имеющиеся данные.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Получение конструкции, кодирующей белок W8-3C, и его продуцента на основе *E. coli*. Получена экспрессионная конструкция pE2-W8-3C (рис. 1б) путем введения в базовую конструкцию pE2-W8 (рис. 1а) фрагмента, кодирующего пептид из 12 а.о. (GGGCGGGCGGGC) и стоп-кодона. Последовательность гена белка W8-3C в составе данной конструкции была подтверждена рестрикционным картированием, полимеразной цепной реакцией со специфичными праймерами и секвенированием по Сэнгеру.

Культивирование продуцента белка W8-3C и его очистка. В результате культивирования и очистки

Таблица 1. Данные по цитотоксической активности SeNP, стабилизированных белком W8-3C, в отношении опухолевых линий и нормальных фибробластов человека, полученные с помощью МТТ-теста через 24 ч и 48 ч

Название клеточной линии	Формула аппроксимации, величина достоверности аппроксимации R^2	IC_{50} мкг/мл	
		24 ч	48 ч
WI-38 — нормальные диплоидные фибробласты человека	(24 ч) $y = -1.6284x + 81.751$, $R^2 = 0.9177$ (48 ч) $y = -1.8874x + 76.955$, $R^2 = 0.7108$	19.5	14.3
HCT-116 — колоректальная карцинома человека	(24 ч) $y = -1.4581x + 97.257$, $R^2 = 0.1765$ (48 ч) $y = -3.1082x + 69.431$, $R^2 = 0.9366$	32.41*	5.25
U-87 MG — злокачественная глиома человека	(24 ч) $y = -3.4453x + 90.127$, $R^2 = 0.8946$ (48 ч) $y = -4.7280x + 75.856$, $R^2 = 0.9191$	11.65	5.47
HeLa — рак шейки матки человека	(24 ч) $y = -1.5005x + 75.102$, $R^2 = 0.2685$ (48 ч) $y = -3.8960x + 74.220$, $R^2 = 0.9292$	16.73*	6.22
MCF-7 — аденокарцинома протоков молочной железы человека	(24 ч) $y = -4.1562x + 91.943$, $R^2 = 0.7940$ (48 ч) $y = -3.0345x + 75.394$, $R^2 = 0.9648$	10.09	8.37

Примечание. В ячейках таблицы приведены концентрации полумаксимального ингибирования роста IC_{50} , рассчитанные методом линейной экстраполяции; R^2 — величина достоверности аппроксимации; * — данные недостоверны.

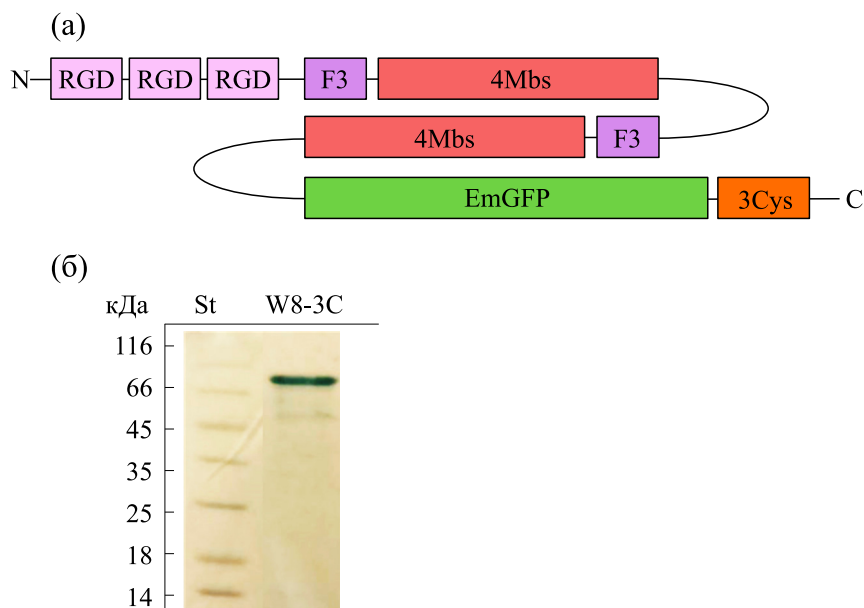


Рис. 2. (а) — Условная схема расположения основных функциональных элементов в белке W8-3C. Условные обозначения те же, что на рис. 1. N- и C-концы белка обозначены соответствующими буквами. (б) — Электрофореграмма очищенного белка W8-3C в SDS-PAAG после переноса на мембрану и окраски Амидовым черным. St — стандарт молекулярной массы (Fermentas, Канада).

получен белок W8-3C с выходом очищенного белка 18–20 мг/л культуры. Условная схема расположения основных функциональных элементов белка W8-3C показана на рис. 2а. Молекулярная масса белка составила 68.4 кДа, чистота по электрофорезу — не менее 95% (рис. 2б), концентрация 3 мг/мл (43.86 мкМ).

Исследование физико-химических характеристик дисперсий наночастиц Se, полученных в присутствии плуроника F-127 и белка W8-3C. На предварительной стадии эксперимента были опробованы несколько протоколов получения наночастиц Se (данные не приводятся). Наиболее эффективными с точки зрения выхода частиц оказались методы получения частиц с применением в качестве пассивирующего агента либо только белка W8-3C, либо белка с добавлением плуроника F-127 [36]. Однако дисперсии SeNP, полученные в присутствии белка W8-3C и плуроника, характеризовались неудовлетворительной стабильностью: при хранении при 4°C в течение 10–15 суток они агрегировали и выпадали в осадок. По данным ICP-OES, максимальное содержание Se в составе свежеполученной в присутствии плуроника F-127 дисперсии наночастиц составляла 399 мкг/мл.

Напротив, дисперсия наночастиц Se, полученных в присутствии только белка W8-3C, не претерпевала каких-либо видимых изменений при хранении в течение 6 месяцев при 4°C (рис. 3). По данным ICP-OES, максимальное содержание Se в

составе наночастиц, полученных в присутствии только белка W8-3C, составляла 1566 мкг/мл.

По данным спектроскопии динамического рассеяния света, средний диаметр наночастиц, полученных в присутствии белка W8-3C, составлял 75.24 нм при индексе полидисперсности $Pdi = 0.064$ (рис. 3).

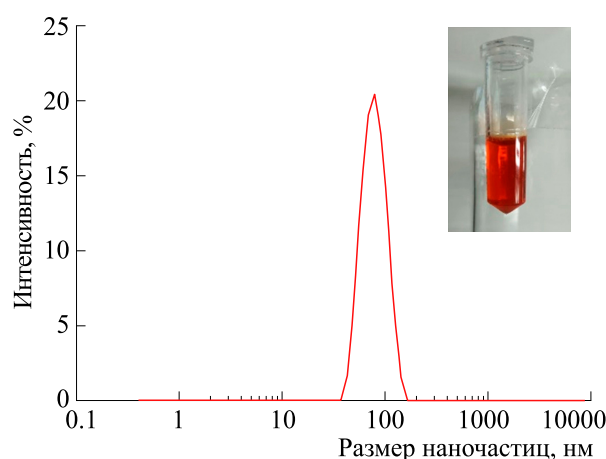


Рис. 3. Распределение по размеру наночастиц SeNP, полученных в присутствии W8-3C. Данные получены методом динамического рассеяния света. На врезке фотография раствора SeNP, полученных в присутствии W8-3C, через 6 месяцев хранения при 4°C после синтеза.

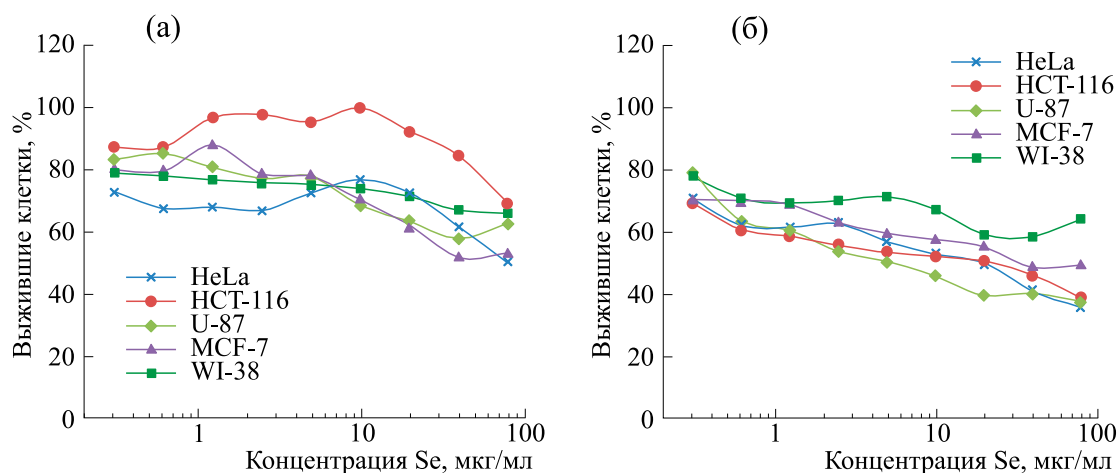


Рис. 4. Анализ по результатам МТТ-теста доли выживших клеток, подвергшихся в течение 24 (а) и 48 ч (б) воздействию разной концентрации наночастиц SeNP, полученных в присутствии W8-3C. Результаты представлены как процентная доля выживших клеток по отношению к контролю (интактным клеткам той же линии, не подвергавшимся воздействию цитотоксических веществ). На графике показаны значения, полученные по результатам усреднения трех независимых экспериментов.

Оценка цитотоксической активности наночастиц Se, полученных в присутствии белка W8-3C, на опухолевых клетках *in vitro*. Цитотоксичность исследуемых наночастиц Se, полученных в присутствии белка W8-3C, на различные опухолевые клетки человека (HeLa, U-87 MG, MCF-7, HCT-116) в сравнении с диплоидной линией фибробластов человека (WI-38) оценивали с помощью колориметрического МТТ-теста, позволяющего оценить общую метаболическую активность культуры. Клетки инкубировали с дисперсиями частиц SeNP, стабилизированных белком W8-3C, в диапазоне концентраций (по Se) от 0.3 до 78 мкг/мл. Оценку метаболической активности клеток с помощью МТТ-теста проводили через 24 и 48 ч (рис. 4). Полученные значения использовали для расчета величин полумаксимального ингибирования роста IC_{50} методом линейной экстраполяции (табл. 1).

Установлено, что инкубация клеток с дисперсией SeNP, полученных в присутствии белка W8-3C, приводила к снижению пролиферативной активности клеток. Однако даже при максимальной концентрации наночастиц (78 мкг/мл по Se) часть клеток сохраняла жизнеспособность. Воздействие на опухолевые клетки в течении 48 ч наночастиц Se, полученных в присутствии белка W8-3C, приводило к существенному нарастанию цитотоксического эффекта. Так, для U-87 MG (злокачественная глиома человека) расчетная концентрация полумаксимального ингибирования (IC_{50}) через 24 ч эксперимента составила 11.65 мкг/мл, а через 48 ч этот показатель упал до 5.47 мкг/мл. При этом нормальные клетки (диплоидные фибробласты человека) проявляли большую устойчивость к действию частиц, чем

все исследованные опухолевые линии. Клетки опухолевой линии HCT-116 (колоректальная карцинома человека) также показали высокую чувствительность к наночастицам Se, полученным в присутствии белка W8-3C: IC_{50} через 48 ч эксперимента для них составила 525 мкг/мл Se. Можно предположить, что высокая эффективность действия в отношении клеток глиомы SeNP, полученных с помощью белка W8-3C, обусловлена наличием на их поверхности $\alpha\beta 3$ -интегринов и нуклеолина [37], являющихся рецепторами лигандов, входящих в состав W8-3C.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В рамках настоящей работы впервые было описано создание и использование для наработки белкового продукта конструкции pW8-3C (рис. 2). Продуктивность штамма BL21(DE3, pW8-3C) по выходу очищенного белкового продукта составила 18–20 мг/л, что практически совпадает с продуктивностью штамма на основе конструкции pE2-W8. Данный показатель позволяет считать вновь созданный продукт перспективным для практического использования. Белок W8-3C был очищен до гомогенного состояния с использованием ранее описанной методики [36], позволяющей применять металлоаффинную хроматографию для очистки белков, несущих центры прочного связывания двухвалентных катионов, к которым относится W8-3C.

Использование белка W8-3C для синтеза SeNP дало хороший выход частиц по включению в них Se. Реакция протекала при комнатной температуре в течение ~1 ч. Об окончании реакции можно было следить по развитию характерной оранже-

вой окраски. При этом необходимо отметить, что введенный в реакцию боргидрид натрия присутствовал в недостатке по сравнению с селенитом натрия (13.5 мМ против 50 мМ). Полученные результаты позволяют предполагать, что белок W8-3C в будущем может быть использован не только для синтеза SeNP, но и для функционализации наночастиц золота, с которыми свободные остатки Cys, имеющиеся в составе деструктурированной последовательности на С-конце этого белка, могут образовывать прочные ковалентные связи [38].

Наиболее значимым результатом настоящей работы является демонстрация высокой эффективности искусственного белка W8-3C в качестве средства для пассивирования поверхности наночастиц Se, что обеспечивает устойчивость дисперсии SeNP при хранении. Показатель устойчивости наночастиц Se — сохранность гранулометрических характеристик дисперсии диаметром ~75 нм в течение 6 мес. хранения при 4°C — не был достигнут ни в одной из ранее опубликованных работ по этой теме. При этом содержание Se в дисперсии составляет ~1.5 мг/мл, что в 3.75 раза превышает показатель, достигнутый в нашей работе при использовании сочетания W8-3C с плюроником F-127, и в 5–7 раз выше максимальных показателей, приведенных в опубликованных работах [33]. Столь высокий показатель устойчивости частиц в растворе позволяет в будущем провести весь необходимый цикл работ по изучению механизма цитотоксического действия наночастиц селена, который, несмотря на высокий интерес, до настоящего времени остается малоизученным. Основной причиной сложности расшифровки этого механизма, очевидно, является трудность воспроизведения биологических экспериментов с участием SeNP, полученных при использовании ранее предложенных пассивирующих агентов, ввиду быстрого изменения свойств дисперсий при хранении. Мы предполагаем, что эффективность действия W8-3C в качестве агента, стабилизирующего наночастицы Se при хранении, является низкой гидрофобность, нехарактерная для природных белков, близкая к нейтральной изоэлектрическая точка, а также наличие трех свободных остатков Cys, эффективно участвующих в формировании ковалентных связей с атомами Se, входящими в кристаллическую решетку наночастиц.

Помимо этого, важным результатом нашей работы является демонстрация избирательности цитотоксического действия SeNP, полученных в присутствии белка W8-3C, в отношении четырех опухолевых линий, в том числе такой устойчивой к химиопрепаратам линии, как U-87 MG (злокачественная глиома человека). Через 48 ч инкубации с SeNP IC₅₀ для нормальных фибробластов

оказалась в 1.7–2.7 раз выше, чем для опухолевых линий карцином толстой кишки, шейки матки и молочной железы, а также глиобластомы.

Мы предполагаем, что избирательность действия наночастиц в отношении опухолевых линий достигнута, в первую очередь, за счет оптимального размера наночастиц ~75 нм, достигнутого при выбранных соотношениях концентраций селенита натрия, белка W8-3C и боргидрида натрия во время синтеза наночастиц. Кроме того, вероятно, сыграло роль присутствие в составе белка W8-3C белковых мотивов F3 и RGD, обладающих тропностью к поверхностным онкомаркерам, представленным на большинстве типов опухолей. Не исключено также, что обнаруженная избирательность цитотоксического действия наночастиц Se обусловлена различиями в функционировании дыхательной цепи митохондрий и систем антиоксидантной защиты по сравнению с нормальными клетками, в частности проявляющейся в виде склонности опухолевых линий к анаэробному метаболизму (эффект Варбурга) [39].

Эффективность предложенного способа синтеза наночастиц Se по выходу продукта и обнаруженные соотношения их токсичности в отношении опухолевых линий и нормальных фибробластов позволяет планировать эксперименты по тестированию наночастиц в качестве цитотоксического агента для сдерживания роста опухолевых очагов и метастаз [7]. Известные данные позволяют предполагать, что при правильном подборе терапевтической дозы наночастицы Se будут обладать достаточно низкой побочной токсичностью, эффективно сдерживая рост опухолей. Так, в работах [40, 41] сообщается, что LD₅₀ SeNPs для мышей составляет примерно 91.2–258.2 мг Se на кг массы тела, тогда как LD₅₀ метилселеноцистеина составила 22.0 мг/кг, а LD₅₀ H₂SeO₃ — 14.6 мг/кг.

Кроме того, наночастицы Se могут быть использованы в качестве вектора для адресной доставки в опухоли цитотоксических агентов, содержащих сульфгидрильные группы (в том числе искусственно вводимые в рекомбинантные белки): рицина, вискумина, дифтерийного токсина, цисплатина и других [42–44]. Вероятно, эти частицы могут быть использованы и для доставки гидрофобных цитостатиков, обладающих недостаточной растворимостью в плазме крови, в том числе таких популярных, как доксорубин, винкристин, такселы, блеомицин, метотрексат и другие [45, 46].

БЛАГОДАРНОСТИ

Коллектив авторов выражает благодарность сотрудникам лаборатории радионуклидных и

лучевых технологий в экспериментальной онкологии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России В.А. Скрибичкому и К.Е. Шпаковой за неоценимую помощь с проведением элементного анализа методом оптико-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с изложенными в статье данными.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания собственных исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Jan N., Shah H., Khan S., Nasar F., Madni A., Badshah S. F., Ali A., and Bostanudin M. F. Old drug, new tricks: polymer-based nanoscale systems for effective cytarabine delivery. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **397**, 3565–3584 (2024). DOI: 10.1007/s00210-023-02865-z
- Bareja S. and Sharma R. K. Comparative effects of chemical and green zinc oxide nanoparticles in caprine testis: ultrastructural and steroidogenic enzyme analysis. *Ultrastruct. Pathol.*, **48** (1), 42–55, (2024). DOI: 10.1080/01913123.2023.2286963
- Barchielli G., Capperucci A., and Tanini D. The role of selenium in pathologies: an updated review. *Antioxidants (Basel)*, **11** (2), 251 (2022). DOI: 10.3390/antiox11020251
- Mesalam N. M., Ibrahim M. A., Mousa M. R., and Said N. M. Selenium and vitamin E ameliorate lead acetate-induced hepatotoxicity in rats via suppression of oxidative stress, mRNA of Heat shock proteins, and NF- κ B production. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, **79**, 127256 (2023). DOI: 10.1016/j.jtemb.2023.127256
- Anghinoni J. M., Birmann P. T., da Rocha M. J., Gomes C. S., Davies M. J., Brüning C. A., Savegnago L., and Lenardão E. J. Recent advances in the synthesis and antioxidant activity of low molecular mass organoselenium molecules. *Molecules (Basel)*, **28**, 7349 (2023). DOI: 10.3390/molecules28217349
- Dogaru C.B., Muscurel C., Duță C., and Stoian I. “Alphabet” selenoproteins: their characteristics and physiological roles. *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 15992 (2023). DOI: 10.3390/ijms242115992
- Hosnedlova B., Kepinska M., Skalickova S., Fernandez C., Ruttkay-Nedecky B., Peng Q., Baron M., Melcova M., Opatrilova R., Zidkova J., Björklund G., Sochor J., and Kizek R. Nano-selenium and its nanomedicine applications: a critical review. *Int. J. Nanomedicine*, **2018** (13), 2107–2128 (2018). DOI: 10.2147/IJN.S157541
- Davis S. S. Biomedical applications of nanotechnology – implications for drug targeting and gene therapy. *Trends Biotechnol.*, **15**, 217–224 (1997). DOI: 10.1016/S0167-7799(97)01036-6
- Khurana A., Tekula S., Saifi M. A., Venkatesh P., and Godugu C. Therapeutic applications of selenium nanoparticles. *Biomed. Pharmacother.*, **111**, 802–812 (2019). DOI: 10.1016/j.biopha.2018.12.146
- Pehlivan Ö., Waliczek M., Kijewska M., and Stefanowicz P. Selenium in peptide chemistry. *Molecules (Basel)*, **28**, 3198 (2023). DOI: 10.3390/molecules28073198
- Zhao J., Wang Z., Zhong M., Xu Q., Li X., Chang B., and Fang J. Integration of a diselenide unit generates fluorogenic camptothecin prodrugs with improved cytotoxicity to cancer cells. *J. Med. Chem.*, **64**, 17979–17991 (2021). DOI: 10.1021/acs.jmedchem.1c01362
- Selmani A., Ulm L., Kasemets K., Kurvet I., Erceg I., Barbir R., Pem B., Santini P., Marion I. D., Vinković T., Krivohavek A., Sikirić M. D., Kahru A., and Vrček I. V. Stability and toxicity of differently coated selenium nanoparticles under model environmental exposure settings. *Chemosphere*, **250**, 126265 (2020). DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.126265
- Kumari M., Ray L., Purohit M. P., Patnaik S., Pant A. B., Shukla Y., Kumar P., and Gupta K. C. Curcumin loading potentiates the chemotherapeutic efficacy of selenium nanoparticles in HCT116 cells and Ehrlich's ascites carcinoma bearing mice. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **117**, 346–362 (2017). DOI: 10.1016/j.ejpb.2017.05.003
- Wang Y., Chen P., Zhao G., Sun K., Li D., Wan X., and Zhang J. Inverse relationship between elemental selenium nanoparticle size and inhibition of cancer cell growth *in vitro* and *in vivo*. *Food Chem. Toxicol. Int. J.*, **85**, 71–77 (2015). DOI: 10.1016/j.fct.2015.08.006
- Peng D., Zhang J., Liu Q., and Taylor E. W. Size Effect of elemental selenium nanoparticles (Nano-Se) at supranutritional levels on selenium accumulation and glutathione S-transferase activity. *J. Inorg. Biochem.*, **101**, 1457–1463 (2007). DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2007.06.021
- Zhou Y., Xu M., Liu Y., Bai Y., Deng Y., Liu J., and Chen L. Green synthesis of Se/Ru alloy nanoparticles using gallic acid and evaluation of their anti-invasive effects in HeLa cells. *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, **144**, 118–124 (2016). DOI: 10.1016/j.colsurfb.2016.04.004
- Liu T., Zeng L., Jiang W., Fu Y., Zheng W., and Chen T. Rational design of cancer-targeted selenium nanoparticles to antagonize multidrug resistance in cancer cells.

- Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.*, **11**, 947–958 (2015). DOI: 10.1016/j.nano.2015.01.009
18. Hien N. Q., Tuan P. D., Van Phu D., Lan N. T. K., Duy N. N., and Hoa T. T. Gamma Co-60 ray irradiation synthesis of dextran stabilized selenium nanoparticles and their antioxidant activity gamma Co-60 ray irradiation synthesis of dextran stabilized selenium nanoparticles and their antioxidant activity. *Mater. Chem. Phys.*, **205**, 29–34 (2018). DOI: 10.1016/j.matchemphys.2017.11.003
 19. Jia X., Liu Q., Zou S., Xu X., and Zhang L. Construction of selenium nanoparticles/ β -glucan composites for enhancement of the antitumor activity. *Carbohydr. Polym.*, **117**, 434–442 (2015). DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.09.088
 20. Nguyen D. N., Van Dang P., Le Q. A., Kim Nguyen L. T., Nguyen H. Q., Thu Tran N. T., Le Bao Tran H., Phan T. D., and Bui H. M. Preparation and effect of selenium nanoparticles/oligochitosan on the white blood cell recovery of mice exposed to gamma-ray radiation. *J. Chem.*, **2021**, e6635022 (2021). DOI: 10.1155/2021/6635022
 21. Yang F., Tang Q., Zhong X., Bai Y., Chen T., Zhang Y., Li Y., and Zheng W. Surface decoration by spirulina polysaccharide enhances the cellular uptake and anticancer efficacy of selenium nanoparticles. *Int. J. Nanomed.*, **7**, 835–844 (2012). DOI: 10.2147/IJN.S28278
 22. Bai K., Hong B., He J., Hong Z., and Tan R. Preparation and antioxidant properties of selenium nanoparticles-loaded chitosan microspheres. *Int. J. Nanomed.*, **12**, 4527–4539 (2017). DOI: 10.2147/IJN.S129958
 23. Wang Z., Ji L., Ren Y., Liu M., Ai X., and Yang C. Preparation and anti-tumor study of dextran 70,000-selenium nanoparticles and poloxamer 188-selenium nanoparticles. *AAPS Pharm.Sci.Tech*, **23**, 29 (2021). DOI: 10.1208/s12249-021-02141-4
 24. Mekki A. I., Fathy M., and Mohamed H. B. Evaluation of different surface coating agents for selenium nanoparticles: enhanced anti-inflammatory activity and drug loading capacity. *Drug Des. Devel. Ther.*, **16**, 1811–1825 (2022). DOI: 10.2147/DDDT.S360344
 25. Lin Z.-H. and Wang C.-R. Evidence on the size-dependent absorption spectral evolution of selenium nanoparticles. *Mater. Chem. Phys.*, **92**, 591–594 (2005). DOI: 10.1016/j.matchemphys.2005.02.023
 26. Hoffmann P. R. and Berry M. J. The Influence of selenium on immune responses. *Mol. Nutr. Food Res.*, **52**, 1273–1280 (2008). DOI: 10.1002/mnfr.200700330
 27. Zeng H. and Combs G. F. Selenium as an anticancer nutrient: roles in cell proliferation and tumor cell invasion. *J. Nutr. Biochem.*, **19**, 1–7 (2008). DOI: 10.1016/j.jnutbio.2007.02.005
 28. Noè R., Inglese N., Romani P., Serafini T., Paoli C., Calciolari B., Fantuz M., Zamborlin A., Surdo N. C., Spada V., Spacci M., Volta S., Ermini M. L., Di Benedetto G., Frusca V., Santi C., Lefkimiatis K., Dupont S., Voliani V., Sancineto L., and Carrer A. Organic selenium induces ferroptosis in pancreatic cancer cells. *Redox Biol.*, **68**, 102962 (2023). DOI: 10.1016/j.redox.2023.102962
 29. Philipp T. M., Scheller A. S., Krafczyk N., Klotz L.-O., and Steinbrenner H. Methanethiol: a scent mark of dysregulated sulfur metabolism in cancer. *Antioxidants*, **12** (9), 1780 (2023). DOI: 10.3390/antiox12091780
 30. Fang L., Zhang R., Shi L., Xie J., Ma L., Yang Y., Yan X., and Fan K. Protein-nanocaged selenium induces t(8;21) leukemia cell differentiation via epigenetic regulation. *Adv. Sci.*, **10** (35), e2300698 (2023). DOI: 10.1002/advs.202300698
 31. Varlamova E. G., Goltyshev M. V., Mal'tseva V. N., Turovsky E. A., Sarimov R. M., Simakin A. V., and Gudkov S. V. Mechanisms of the cytotoxic effect of selenium nanoparticles in different human cancer cell lines. *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 7798 (2021). DOI: 10.3390/ijms22157798
 32. Pelyhe C. and Mezes M. Myths and facts about the effects of nano selenium in farm animals - mini-review. *Eur. Chem. Bull.*, **2**, 1049–1052 (2013).
 33. Dung N. T., Trong T. D., Vu N. T., Binh N. T., Minh T. T. L., and Luan L. Q. Radiation synthesis of selenium nanoparticles capped with β -glucan and its immunostimulant activity in cytoxan-induced immunosuppressed mice. *Nanomaterials*, **11** (9), 2439 (2021). DOI: 10.3390/nano11092439
 34. Yazdi M. H., Mahdavi M., Faghfuri E., Faramarzi M. A., Sepehrizadeh Z., Hassan Z. M., Gholami M., and Shahverdi A. R. Th1 immune response induction by biogenic selenium nanoparticles in mice with breast cancer: preliminary vaccine model. *Iran. J. Biotechnol.*, **13** (2), 1–9 (2015). DOI: 10.15171/ijb.1056
 35. Spyridopoulou K., Aindelis G., Pappa A., and Chlichlia K. Anticancer activity of biogenic selenium nanoparticles: apoptotic and immunogenic cell death markers in colon cancer cells. *Cancers*, **13**, 5335 (2021). DOI: 10.3390/cancers13215335
 36. Pozdniakova N. V., Ryabaya O. V., Semkina A. S., Skribitsky V. A., and Shevelev A. B. Using ELP repeats as a scaffold for de novo construction of gadolinium-binding domains within multifunctional recombinant proteins for targeted delivery of gadolinium to tumour cells. *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 3297 (2022). DOI: 10.3390/ijms23063297
 37. Koutsoumpa M., Polyarchou C., Courty J., Zhang Y., Kieffer N., Mikelis C., Skandalis S. S., Hellman U., Iliopoulos D., and Papadimitriou E. Interplay between $\text{Av}\beta 3$ Integrin and nucleolin regulates human endothelial and glioma cell migration. *J. Biol. Chem.*, **288**, 343–354 (2013). DOI: 10.1074/jbc.M112.387076
 38. Zhu X., Liu H., Dai Y., Wang X., Luo C., and Wei Q. Enhanced electrochemiluminescence of luminol based on

- Cu₂O-Au heterostructure enabled multiple-amplification strategy. *Biosens. Bioelectron.*, **151**, 111970 (2020). DOI: 10.1016/j.bios.2019.111970
39. Lin J., Liu Y., Liu P., Qi W., Liu J., He X., Liu Q., Liu Z., Yin J., Lin J., Bao H., and Lin J. SNHG17 alters anaerobic glycolysis by resetting phosphorylation modification of PGK1 to foster pro-tumor macrophage formation in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **42**, 339 (2023). DOI: 10.1186/s13046-023-02890-z
 40. Zhang J., Wang X., and Xu T. Elemental selenium at nano size (nano-Se) as a potential chemopreventive agent with reduced risk of selenium toxicity: comparison with Se-methylselenocysteine in mice. *Toxicol. Sci.*, **101**, 22–31 (2008). DOI: 10.1093/toxsci/kfm221
 41. Zhai X., Zhang C., Zhao G., Stoll S., Ren F., and Leng X. Antioxidant capacities of the selenium nanoparticles stabilized by chitosan. *J. Nanobiotechnol.*, **15**, 4 (2017). DOI: 10.1186/s12951-016-0243-4
 42. Bidkar A. P., Sanpui P., and Ghosh S. S. Efficient induction of apoptosis in cancer cells by paclitaxel-loaded selenium nanoparticles. *Nanomed.*, **12**, 2641–2651 (2017). DOI: 10.2217/nnm-2017-0189
 43. Felenda J. E., Turek C., and Stintzing F. C. Antiproliferative potential from aqueous *Viscum Album* L. preparations and their main constituents in comparison with ricin and purothionin on human cancer cells. *J. Ethnopharmacol.*, **236**, 100–107 (2019). DOI: 10.1016/j.jep.2019.02.047
 44. Nazari M., Emamzadeh R., Jahanpanah M., Yazdani E., and Radmanesh R. A recombinant affitoxin derived from a HER3 affibody and diphtheria-toxin has potent and selective antitumor activity. *Int. J. Biol. Macromol.*, **219**, 1122–1134 (2022). DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2022.08.150
 45. Shah N., Mohammad A. S., Saralkar P., Sprowls S. A., Vickers S. D., John D., Tallman R. M., Lucke-Wold B. P., Jarrell K. E., Pinti M., Nolan R. L., and Lockman P. R. Investigational chemotherapy and novel pharmacokinetic mechanisms for the treatment of breast cancer brain metastases. *Pharmacol. Res.*, **132**, 47–68 (2018). DOI: 10.1016/j.phrs.2018.03.021
 46. Ali I., Rahis-Uddin, Salim K., Rather M. A., Wani W. A., and Haque A. Advances in nano drugs for cancer chemotherapy. *Curr. Cancer Drug Targets*, **11** (2), 135–146 (2011). DOI: 10.2174/156800911794328493

Study of Cytotoxicity of Selenium Nanoparticles Synthesized Using Artificial Metal-Binding Tumor-Specific Protein W8-3C

N.V. Pozdnyakova*, **, Yu.K. Biryukova***, Z.A. Sokolova*, M.A. Baryshnikova*,
E.S. Shcherbakova**, ****, M.S. Smirnova**, and A.B. Shevelev**

*N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of the Russian Federation,
Kashirskoe Shosse 24, Moscow, 115522 Russia

**N.I. Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, ul. Gubkina 3, Moscow, 119991 Russia

***N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia

****Research Laboratory "Genetics", Kursk State University, ul. Radishcheva 33, Kursk, 305000 Russia

For the first time, the pW8-3C construct encoding the artificial tumor-specific protein W8-3C with the addition of 3 residues of free Cys at the C end was created and described. Using purified W8-3C protein, dispersions of nanoparticles 75.24 nm in diameter at polydispersity index (Pdi) of 0.064 and Se content of 1566 µg/mL were obtained and characterized for the first time. The dispersions remained stable upon storage for 6 months at +4°C. For comparison, the maximum Se content in the nanoparticle dispersion obtained in the presence of W8-3C protein and Pluronic F-127 was 399 µg/mL. The cytotoxic activity of the obtained nanoparticles was studied on transplanted cells of human tumor lines: HeLa (cervical carcinoma), U-87 MG (glioblastoma), MCF-7 (breast carcinoma) and HCT-116 (colon carcinoma) and compared with that on the diploid human fibroblast line WI-38 *in vitro*. It was shown that the *IC*₅₀ of Se nanoparticles obtained using the W8-3C protein for tumor lines ranged from 5.25 to 8.37 µg/mL, while the *IC*₅₀ for normal fibroblasts was 14.3 µg/mL (difference in values by a factor of 1.7–2.7 times).

Keywords: selenium, nanoparticles, recombinant protein, tumor, cytotoxicity, *IC*₅₀, cysteine